

Aus dem Fachbereich 1 - Vorklinik -
der Freien Universität Berlin
Institut für
Molekularbiologie und Biochemie

**Untersuchungen an einer löslichen
Ribonukleinsäure-Fraktion aus
Hühnerembryonen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rosemarie Krönicher
aus Kirchhain/NL

1976

Aus dem Fachbereich 1 - Vorklinik -
der Freien Universität Berlin
Institut für
Molekularbiologie und Biochemie

**Untersuchungen an einer löslichen
Ribonukleinsäure-Fraktion aus
Hühnerembryonen**



Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rosemarie Krönicher
aus Kirchhain/NL

Referent: Prof. Dr. Dr. med. H. Tiedemann

Korreferent: Prof. Dr. med. Diether Neubert



Promoviert am: 27.3.76.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	1
A: Einleitung	2
B: Methoden und Ergebnisse	4
1. Gewinnung der RNS-Fraktion	4
2. Trennung der RNS an der Sephadex-G-100	5
3. Chromatographie an Hydroxylapatit	11
4. Elektrophorese in Polyacrylamid	14
a. Analytische Trennung	14
b. Präparative Trennung	29
5. Bestimmung der Transfer-Aktivität der RNS-Fraktion	34
6. Isolierung einer RNS-Fraktion unter Zusatz von markierter hochmolekula- rer RNS	35
C: Diskussion	43
D: Literaturverzeichnis	50
Lebenslauf	53



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548818_0093

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
Ci	Curie
CpM	Counts pro Minute (Impulse pro Minute)
^{14}C -RNS	Mit ^{14}C markierte Ribonukleinsäure
DiNa-AEDTA	Dinatriumsalz der Äthylendiamintetra- essigsäure
DMAPN	3-Dimethylaminopropionitril
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E_{260} bzw. E_{280}	Extinktion gemessen bei 260 bzw. 280 nm im Zeiss-Photometer
HP	Hydroxylapatit
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RpM	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s-RNS	lösliche Ribonukleinsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNS	transfer-Ribonukleinsäure

A. EINLEITUNG

Die Suche nach den biologischen Mechanismen der embryonalen Differenzierung führte zur Entdeckung spezifischer Induktionsfaktoren, die die Differenzierung in z.B. mesodermales oder neurales Gewebe veranlassen. (1,2,3). Da Induktionsfaktoren in Embryonen auch in Regionen gefunden werden, die nicht zu dem entsprechenden Gewebe induziert werden, muß man zwangsläufig Mechanismen annehmen, die die Bildung der Induktionsfaktoren oder deren Wirkung auf das Embryonalgewebe hemmen. Tatsächlich konnten aus Hühnerembryonen durch Homogenisieren und hochtourigem Zentrifugieren ein mesodermaler Induktionsfaktor in praktisch inaktiver Form isoliert werden. Nach Extraktion mit Phenol und Fällung des Proteins aus der Phenolphase konnte der Induktionsfaktor aktiviert werden. Die Induktionsaktivität konnte wiederum durch die wässrige Phase der Phenolextraktion gehemmt werden. Diese Phase enthält Ribonukleinsäuren und Glykoproteide. In ihr muß sich also ein Inhibitor befinden, der die Induktionsfähigkeit des mesodermalen Faktors hemmt (4,5).

Unabhängig von der Frage, auf welchem Bestandteil der H_2O -Phase die Inhibitoreigenschaft beruht, wurde die Ribonukleinsäurefraktion, die in der Hauptsache niedermolekulare RNS enthält, untersucht.

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Trennmethode für Ribonukleinsäuren verglichen. Dabei ist die Frage, ob mehrere RNS-Fractionen mit verschiedenem Molekulargewicht vorliegen, von besonderem Interesse. Die Methoden, die im einzelnen zur Trennung der RNS-Fraktion angewand werden, sind:

1. Die Chromatographie an Sephadex-Säulen in Abhängigkeit von verschiedenen Säulenlängen und Puffersystemen.
2. Die Hydroxylapatit-Chromatographie mit verschiedenen Elutionspuffern.
3. Die Gel-Elektrophorese in Polyacrylamidgel mit dem Versuch der qualitativen und quantitativen Auftrennung.

Die RNS, die zur Auftrennung eingesetzt wird, wird aus Hühnerembryonen isoliert. Durch Modifikation der präparativen Methoden wird dabei versucht, die niedermolekulare RNS-Fraktion, die ich im folgenden als s-RNS bezeichne, in verschiedenen Reinheitsgraden zu erhalten und mit diesen verschiedenen reinen RNS-Präparationen eine Aussage über die Trennfähigkeit der oben angeführten Methoden zu erhalten.

B. METHODEN UND ERGEBNISSE

1. Gewinnung der RNS-Fraktion

Gefrorene Hühnerembryonenrumpfe werden nach dem Auftauen zirka 5 Minuten mit 2 Volumen 0,5%iger NaCl-Lösung im Potter-Homogenisator zerkleinert und 2 Stunden bei 105000 x g (=38000 RpM im Titan-50-Rotor) zentrifugiert. Die auf der Oberfläche schwimmende weißliche Lipidschicht wird abgenommen. Der Überstand wird mit 1 Volumen 80%igem Phenol (6,7,8,9) 5 Minuten bei 60°C (Wasserbad) extrahiert, in der Kühlsole schnell auf 7°C abgekühlt und 15 Minuten bei 20000 RpM zentrifugiert. Die H₂O-Phase wird abgenommen und noch einmal mit 1/2 Volumen Phenol 5 Minuten bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Zentrifugation (15 Minuten bei 20000 RpM) wird die wässrige Phase mit 2 Volumen 96%igem Alkohol versetzt und während 20 Minuten in der Kühlsole das Ausfallen der RNS abgewartet. Der Niederschlag wird 3x mit 96%igem Alkohol und 1x mit 66%igem Alkohol gewaschen. Der Niederschlag wird in 2 Teile geteilt und in Puffer mit unterschiedlichem pH-Wert gelöst.

Puffer pH 5,4

1 m NaCl

0,01 m Na-acetat

Puffer pH 7,6

1 m NaCl

0,01 m Tris

Die Spektren beider RNS-Lösungen, von 220 nm bis 300 nm im Zeiss-Photometer gemessen, ergibt die für RNS typische Kurve, die dadurch charakterisiert ist, daß sie bei 235 nm ein Minimum, bei 260 nm ein Maximum hat und daß das Verhältnis E₂₆₀/E₂₈₀ = 2 ist

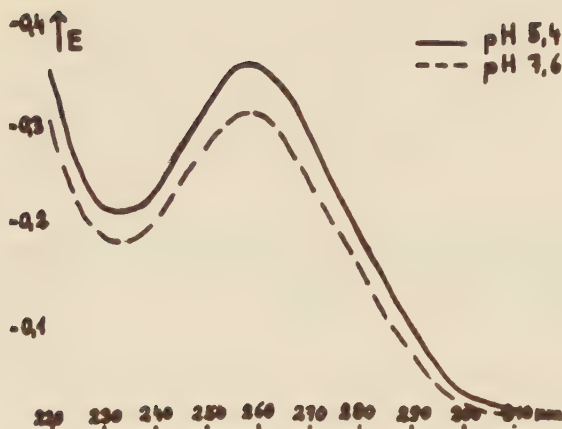


Fig.1: Spektrum der RNS

2. Trennung der RNS an Sephadex G-100

Diese RNS wird nun einer Chromatographie an einer Sephadex-G-100-Säule unterworfen. Sephadex ist ein hochpolymeres Dextran, welches durch eine große Zahl an Hydroxylgruppen eine beträchtliche Quellfähigkeit in Wasser besitzt. Die Einteilung in verschiedene Sephadextypen (z.B. Sephadex-G-25 bis G-200) erfolgt nach dem Vernetzungsgrad. Die chromatographische Auftrennung von Stoffen mit verschiedenen Molekulargewichten bzw. Molekülgrößen erfolgt in der Weise, daß Moleküle, die kleiner als die Poren auf der Oberfläche der Gelperlen sind, in diese hineindiffundieren und so zurückgehalten werden, während die größeren schneller eluiert werden (8).

Die Chromatographie der in Puffer von pH 5,4 bzw. 7,6 gelösten RNS wird an einer 2 m langen Säule aus Sephadex-G-100 durchgeführt.

Chromatographie:

pH 5,4

pH 7,6

Elution: 4,1 ml/20' = 1 Frkt. 4,6 ml/20' = 1 Frkt.

Substanz: 3,75 mg RNS, gel. 3,6 mg RNS, gel.
in 2,6 ml in 2,9 ml

Die Ausmessung der Fraktionen bei 260 und 280 nm im Zeiss-Photometer ergab bei beiden Auftrennungen eine Verteilung in 3 Peaks. (Fig. 2)

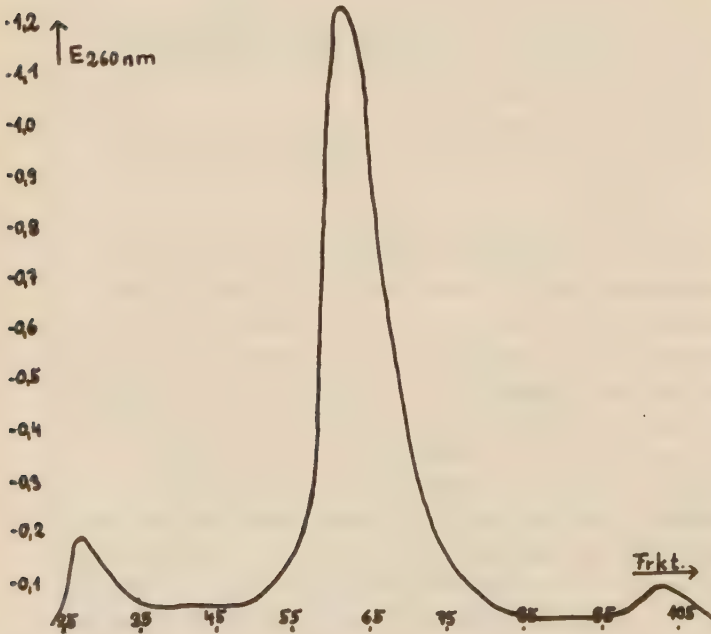


Fig.2: Sephadex G-100-Chromatographie an einer 2m langen Säule

Auch die Chromatographie an einer kurzen Säule von 48 cm ergab prinzipiell das gleiche Bild. Auffällig bei der Auftrennung der RNS an den drei verschiedenen langen Sephadex-Säulen ist das Verhalten des letzten Peaks. Je kürzer die Säule ist, desto größer wird er, während er bei der 2m-Säule kaum in Erscheinung tritt. (Fig. 3a,b,c)

Es stellt sich nun die Frage, ob diese drei Peaks drei echten, verschiedenen RNS-Fractionen mit verschiedenem Molekulargewicht entsprechen, oder ob es sich um während der Aufarbeitung entstandene Abbau-produkte höhermolekulare RNS handelt. Im folgenden wird die oben beschriebene Aufarbeitung der Hühner-embryonen in verschiedener Weise variiert, um eine Antwort auf diese Frage geben zu können. Dabei wird:

1. Die Isolierung und Reinigung der RNS durch zusätzliche Schritte verbessert, um zu sehen, ob einer der Peak kleiner wird oder ganz verschwindet.
2. Die RNS in bestimmten Stadien der Aufarbeitung Einflüssen ausgesetzt, die ihren Abbau begünstigen, um zu sehen, ob einer der Peaks größer wird.

Zu 1: Die oben beschriebene Aufarbeitung wird durch eine dritte Phenolextraktion erweitert: Nach Homogenisieren und Zentrifugieren (s.S.4) folgt:

1. Eine heiße Phenolextraktion mit 1 Volumen 80%-igem Phenol 5 Minuten bei 60°C (Zentrifugieren, Alkoholfällung).

2. Eine kalte Phenolextraktion mit $1/2$ Volumen Phenol
5 Minuten bei Raumtemperatur. Zentrifugieren, Al-
koholfällung und hochtouriges Zentrifugieren der
 H_2O -Phase für 45 Minuten bei 42500 Rpm.
3. Eine heiße Phenolextraktion mit 1 Volumen Phenol
5 Minuten bei $60^\circ C$ (Zentrifugieren, Alkoholfällung).

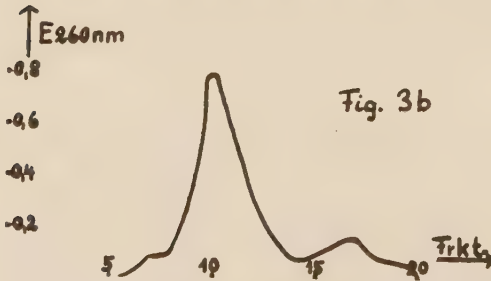
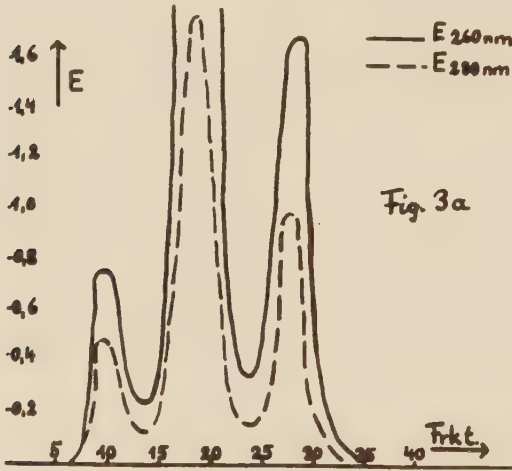


Fig. 3a: Sephadex G-100-Chromatographie an einer 48cm langen Säule (RNS nach 2 Phenolextraktionen).

Fig. 3b: Sephadex G-100-Chromatographie an einer 80cm langen Säule (RNS nach 3 Phenolextraktionen).

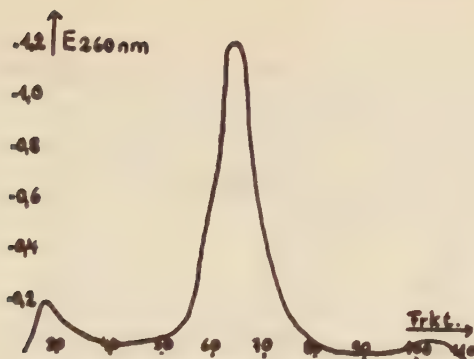


Fig. 3c: Sephadex-G-100-Chromatographie an einer 2m langen Säule (RNS nach 2 Phenolextraktionen).

Nach dem Lösen der Alkoholfällung in 0,5% NaCl folgt eine Dialyse in einem Visking-Dialysierschlauch (ca. 6 Stunden gegen 0,5% NaCl). Durch die Dialyse werden 25-30% RNS in Form von Nucleotiden entfernt. Die Extinktion der so erhaltenen RNS-Lösung (Verdünnung 1:100) beträgt:

$$E_{260} = 0,205$$

$$E_{280} = 0,101$$

Die Chromatographie an einer Sephadex-G-100 Säule (80 cm lang, Durchmesser 1,8 cm) ergab eine Auftrennung in zwei Peaks, wobei der dem höchsten Molekulargewicht entsprechende Peak (Px in Fig. 2) der ersten Chromatographie nicht mehr auftritt (Fig. 3b).

Zu 2: Die Aufarbeitung wird unter Bedingungen durchgeführt, die einen Abbau der RNS begünstigen.

I. Das Homogenat wird 4 1/2 Stunden bei 0°C stehen gelassen. Zu diesem Zeitpunkt ist das Protein noch nicht abgetrennt, so daß die RNase ihre Aktivität entfalten kann. Die vergleichende Sephadex-G-100

Chromatographie ergab eine deutliche Vergrößerung des letzten Peaks (Fig. 4a und b).

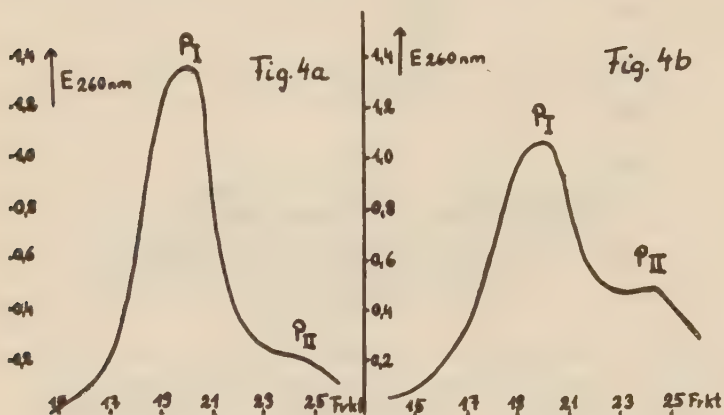


Fig.4a: Sephadex G-100-Chromatographie nach normaler Aufarbeitung

Fig.4b: Sephadex G-100-Chromatographie an einer Probe, deren Homogenat 4 1/2 Std. bei 0°C inkubiert wurde. Deutliche Vergrößerung von PII

II. Eine normal aufgearbeitete RNS wird nach der Dialyse 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Chromatographie ergab im Vergleich zu einer nicht inkubierten Kontrolle praktisch keinen Unterschied. Dies ist durchaus erklärlich, da durch die vorangegangenen Phenolextraktionen die RNase entfernt worden ist.

Die beschriebenen Versuche machen folgendes deutlich:

1. Von den ursprünglich erhaltenen drei Fraktionen bleiben nach sorgfältiger Aufarbeitung nur zwei übrig. Die erste ist nicht mehr nachzuweisen.

2. Die letzte Fraktion mit dem niedrigsten Molekulargewicht scheint zumindest zu einem Teil aus Abbauprodukten höherer RNS zu bestehen. Der Abbau findet in dem Zeitraum statt, der vor der Phenolextraktion liegt.

3. Chromatographie an Hydroxylapatit

Eine andere viel verwandte Methode, Nukleinsäurefraktionen zu untersuchen und aufzutrennen, ist die Hydroxylapatitchromatographie (14-20). Hierbei wird die zu untersuchende Nukleinsäure an Hydroxylapatitkristalle absorbiert und mit Phosphatpuffern verschiedener Konzentration eluiert. Nach Untersuchungen von BERNARDI (14-16) scheint die Absorption der Polynukleotide auf der Wechselwirkung zwischen den negativen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren und den positiven Calciumionen an der Oberfläche der Hydroxylapatitkristalle zu beruhen. Die Auftrennung der Nukleinsäuren an der Hydroxylapatitsäule erfolgt nicht auf der Grundlage des Molekulargewichtes, sondern wahrscheinlich der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur. Über die Beziehung zwischen Molarität des Elutionspuffers und der Sekundärstruktur der eluierten Nukleinsäure ist noch nicht viel bekannt. Nach BERNARDI scheint eine Relation zwischen Molarität des Elutionspuffers und der linearen Ladungsdichte der Polynukleotide zu bestehen, so daß eine doppelsträngige RNS bei einer niedrigeren Molarität eluiert würde als eine dreisträngige, die pro Längeneinheit mehr Phosphatgruppen und daher mehr Ladungen trägt. Die Hydroxylapatitchromatographie ist also in erster Linie ein Verfahren zur Differenzierung der Nukleinsäuren auf Grund ihrer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur.

Abhängig ist das chromatographische Verhalten aber auch von dem Verhältnis Beladung/Menge Hydroxylapatit und von der Art der Elution, d.h. ob man ein kontinuierliches oder diskontinuierliches Elutionspuffersystem verwendet.

Die Chromatographie wurde mit käuflichem Hydroxylapatit (Bio Gel HT) durchgeführt. Um einen guten Durchfluß zu erhalten, müssen die kleineren Partikel durch häufiges Aufschlemmen und Dekantieren entfernt werden. Da die chromatographische Auftrennung von dem Verhältnis Beladung/Bettvolumen abhängig ist, muß die Betthöhe auf die Menge der aufzutragenden Substanz abgestimmt sein. Die beste Auftrennung erhält man bei einem Bettvolumen von 0,7 ccm pro 1 mg RNS.

Puffer-Stammlösung:

A: 1m $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

B: 1m $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

Lösung A und B werden im Verhältnis 1:1 gemischt und aus dieser Stammlösung die Elutionspuffer folgender Molarität hergestellt:

0,002m; 0,1m; 0,2m; 0,5m Natrium-Phosphat

Säule: Betthöhe 2 cm

Durchmesser 0,75 cm

Laufgeschwindigkeit 2 ml/6 Minuten

Substanz:

1,2mg RNS in 3,1ml nach einstündiger

Dialyse gegen 0,002m Phosphatpuffer.

Durchführung: Die RNS-Lösung wird auf die Säule aufgetragen und nach Absorption mindestens 1 Stunde mit 0,002m Puffer nachgewaschen, dann wird nacheinander mit 0,1m, 0,2m und 0,5m Puffer eluiert. Der Puffer wird jeweils gewechselt, wenn in dem Eluat die Extinktion wieder den Basiswert erreicht hat. Die Aus-

messung der Eluate im Zeiss-Fotometer bei 260nm und 280nm ergab eine Auftrennung in drei Fraktionen, die den Molaritäten 0,002, 0,1 und 0,2m entsprachen.

(Fig. 5a)

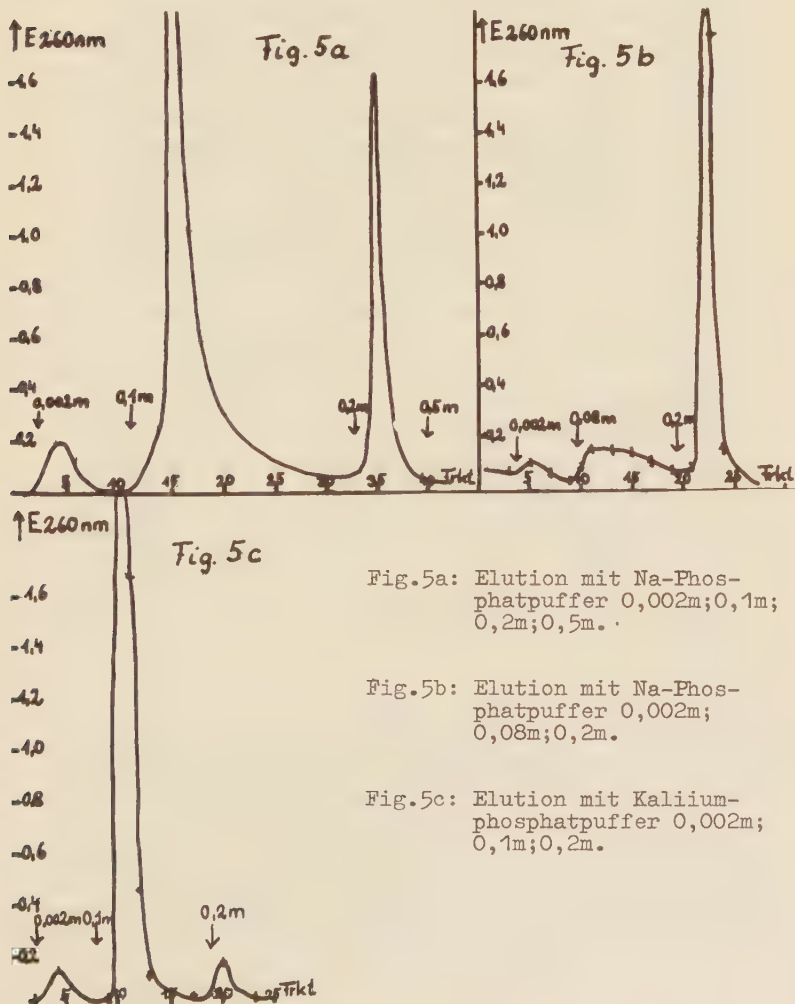


Fig. 5a: Elution mit Na-Phosphatpuffer 0,002m; 0,1m; 0,2m; 0,5m.

Fig. 5b: Elution mit Na-Phosphatpuffer 0,002m; 0,08m; 0,2m.

Fig. 5c: Elution mit Kaliumphosphatpuffer 0,002m; 0,1m; 0,2m.

Durch 0,5m Puffer wurde nichts mehr eluiert. In der ersten Fraktion, die mit 0,002m Phosphatpuffer eluiert wurde, konnte mit der Anthron-Methode (21) ein großer Hexoseanteil festgestellt werden (22). Sie enthält also mit großer Wahrscheinlichkeit die Glycoproteide des chromatographierten Extraktes. Die Verteilung der RNS auf die zwei anderen Peaks scheint in erster Linie von der Molarität der Elutionspuffer, aber auch von dem Kation des Puffers abhängig zu sein. Bei Verwendung von Kaliumphosphat-Puffer, den man im Gegensatz zum Natriumphosphat-Puffer auch zur Chromatographie in der Kälte verwenden kann, findet man bei Elutionsmolaritäten von 0,002, 0,1 und 0,2m eine ganz andere Verteilung der Peaks (Fig. 5c). Ebenso ergibt sich ein von der ersten Auftrennung abweichendes Bild, wenn man mit 0,002, 0,08 und 0,2m Puffer eluiert (Fig. 5b).

Die Verteilung der RNS in zwei Fraktionen bei der Hydroxylapatit-Chromatographie ist also inkonstant und abhängig von den jeweiligen Elutionsbedingungen. Das Verfahren ist aber zur Abtrennung der Glycoproteide aus der RNS-Fraktion geeignet, wenn man diese mit 0,002m Puffer eluiert und dann die RNS mit 0,2m Puffer in einer Fraktion gewinnt.

4. Elektrophorese in Polyacrylamid

4a: Analytische Trennung

Im folgenden wird die elektrophoretische Auftrennung der RNS-Fraktion in Polyacrylamid-Gel untersucht, ein Verfahren, das in den letzten Jahren große Verbreitung gefunden hat (23-29). Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Methode beruht die Auftrennung der Makroionen auf dem Molekularsiebeffekt des

Polyacrylamid-Gels. Die Disk-Elektrophorese (23, 24) bedient sich darüberhinaus noch der Diskontinuität in den pH-Werten der Puffer und der Porengröße der Gele, um die zu trennenden Proben aus verdünnter Lösung in einer scharfen Bande anzureichern. RICHARDS und GRATZER (26, 27) konnten aber zeigen, daß auch ohne diese etwas aufwendige Methode eine gute Auftrennung durch einfache Elektrophorese im kontinuierlichen Puffersystem erreicht werden kann, wenn die Ausgangssubstanzen in hinreichend konzentrierter Lösung vorliegen. Es werden nämlich die RNS-Ionen, wenn sie aus freier Lösung in das Trenngel eintreten, in ihrer Bewegung so abgebremst, daß sie sich in einer Bande am Anfang des Gels anreichern.

Polyacrylamid ist das Polymerisationsprodukt des synthetischen Acrylamids, das zusammen mit einem bivalenten Vernetzer (N, N' - Methylenbisacrylamid) unter Aufspaltung der Doppelbindung zu einem dreidimensionalen Raumnetz zusammentritt. Die Porengröße dieses Raumnetzes ist in erster Linie abhängig von der Monomerenkonzentration, so daß durch geeignete Wahl verschiedene Gele hergestellt werden können, die in unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen optimal trennen. Der Anteil des Vernetzers an der Gesamtmonomerenkonzentration soll hauptsächlich Einfluß auf die mechanische Stabilität haben. Wird der Anteil des Vernetzers zu groß, werden die Gele trübe und brüchig, bei zu geringem Anteil werden sie pappig und zerfallen leicht. RICHARDS und GRATZER (27) entwickelten folgende Formel für die günstigste Zusammensetzung von Acrylamid und Vernetzer:

$$100R = 6,5 - 0,3C$$

R=Gewichtsbruchteil des Vernetzers

C=Gesamtmonomerenkonzentration

Aus eigenen Versuchen ergab sich aber, daß 5%ige Gele bei einem Acrylamid-Bisacrylamid-Verhältnis von 20:1 trüb wurden. (Dieses Verhältnis entspricht der auf Seite 15 aufgeführten Formel). Erst 3%ige Gele bleiben bei diesem Verhältnis klar. Gele mit einer Monomerenkonzentration von 5% blieben bei einem Verhältnis von 40:1 klar.

Die Auftrennung der Makroionen in dem Polyacrylamid-Gel erfolgt entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit, (die abhängig von ihrer Ladung ist) und ihrer Molekülgröße (die in erster Linie vom Molekulargewicht abhängt). Durch den Molekularsiebeffekt werden die Teilchen je nach ihren Dimensionen mehr oder weniger in ihrer Beweglichkeit gebremst. Da bei den Ribonukleinsäuren das Verhältnis Ladung/Masse gleich bleibt, (die Ladung sitzt nur an den Phosphatgruppen und ist unabhängig von der Basenzusammensetzung) erfolgt bei der Polyacrylamid-Elektrophorese der RNS die Auftrennung ausschließlich auf Grund des Molekularsiebeffektes und ist damit abhängig von der Porengröße des Gels.

Methodik der Polyacrylamid-Elektrophorese:

Zur Auftrennung der H_2O -Phase wurde die Polyacrylamid-Elektrophorese im kontinuierlichen und homogenen Puffersystem durchgeführt.

Ausgangssubstanzen: Die Grundlösung zur Herstellung von 10%igem Gel bestand aus Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 40:1. Beide Monomeren wurden aus Aceton umkristallisiert. Zur Einleitung der Polymerisation wurde das Katalysatorenpaar Ammoniumperoxidisulfat und 3-Dimethylaminopropionitril (DMAPN) verwendet, welches durch eine Redoxreaktion aus dem Persulfat freie Radikale liefert. Ähnliche Katalysatorenpaare sind:

Ammoniumperoxydisulfat - N, N, N', N' - Tetramethyläthylendiamin (TEMED)

Riboflavin (als Photokatalysator) - TEMED

Als Puffer wurde ein Tris-Na-AEDTA-Borsäurepuffer nach PEACOCK und DINGMAN (28) mit einem pH-Wert von 8,3 verwendet. Die Pufferlösung, die zur Polymerisation des Gels benutzt wurde, wurde für die Elektrophorese im Verhältnis 10:1 verdünnt.

Grundlösung für Gel: 15g Acrylamid

0,375g Bisacrylamid

H₂O ad 100 ml

Katalysator:

DMAFN 6,4 in H₂O

Peroxydisulfat 1,6% in H₂O

Puffer:

108g Tris

9,3g DiNa-AEDTA

55g Borsäure

H₂O ad 1000ml

Zur qualitativen elektrophoretischen Auftrennung werden Gele benutzt, die in Glasröhrchen mit einem inneren Durchmesser von 6mm bei Raumtemperatur polymerisiert werden.

Polymerisationslösung für 10%iges Gel:

8ml Gel-Grundlösung

0,2ml H₂O

0,8ml Puffer

0,5ml DMAFN (6,4%)

0,5ml Peroxydisulfat (1,6%)

Das Peroxydisulfat wird ganz zum Schluß dazugegeben,

da nach Zugabe von Peroxydisulfat die Polymerisation einsetzt. Dann wird schnell gemischt und das Gemisch mit einer Spritze in die unten mit Parafilm verschlossenen Glasröhrchen in einer Höhe von 5cm eingefüllt. Anschließend wird sofort sehr vorsichtig das Polymerisationsgemisch mit Aqua dest. überschichtet, um eine Meniscusbildung zu verhindern. Die Polymerisation erfolgt in 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach ist die Gelsäule fest und die Oberfläche wird mit Wasser nachgewaschen. Die Glasröhrchen mit dem Gel werden mittels durchbohrter Silikonstopfen in den Elektrophoreseapparat eingesetzt, der aus einem Anoden- und einem Kathodengefäß besteht. Es empfiehlt sich, die Röhrchen, bevor sie mit der zu untersuchenden Substanz beschickt werden, einer Vorelektrophorese zu unterziehen. Innerhalb des polymerisierten Acrylamidgels befinden sich immer noch mehr oder weniger große Anteile des monomeren Acrylamids, sowie als Verunreinigung vorhandene Acrylationen. Dieser Untergrund würde sowohl bei der densitometrischen als auch der färbereischen Darstellung der aufgetrennten Bestandteile stören. Durch eine Vorelektrophorese von zirka 45 Minuten gelingt es, den größten Teil der dissoziierten Acrylsäure zu beseitigen. Nach der Vorelektrophorese wird die zu untersuchende RNS-Lösung nach Entfernung des überstehenden Puffers mit einer Konstriktionspipette direkt auf die Oberfläche des Gels aufgetragen. Es ist günstig, der RNS-Lösung 5-10% Saccharose hinzuzufügen, da durch die Erhöhung des spezifischen Gewichtes bei der anschließenden Überschichtung der Lösung mit Puffer eine Vermischung verhindert werden kann. Nach der Elektrophorese werden die Gelröhrchen mit einem dünnen Stahldraht vorsichtig aus dem Glasmantel gelöst. Zur Darstellung der aufgetrennten Anteile stehen zwei Verfahren zur Verfügung:

1. Färbung: Es werden verschiedene Farbstoffe zur Sichtbarmachung der RNS angegeben (28). Am gebräuchlichsten ist die Färbung mit Methylenblau, die allerdings recht unspezifisch ist.

Fixierung: In 1m Essigsäure während 15 Minuten

Färben: In 0,2% Methylenblau in 0,4m Essigsäure und 0,4m Natriumacetat zu gleichen Teilen während ca. 4 Stunden

Entfärben: Mit Aqua dest. und häufigem Wechseln des Wassers

2. Extinktionsmessung im UV-Licht (27, 29): Die eigenen Messungen wurden in einem Densitometer durchgeführt, das in ein normales Zeiss-Fotometer eingesetzt werden kann. Eine 5cm lange und 0,6cm breite Quarzglasküvette, in die das Gel eingebettet wird, wird auf einem Wagen mittels eines sich drehenden Gewindes vor dem UV-Strahl vorbeibewegt und die Extinktion bei 260nm über einen angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet. Vor der Messung werden die Gele in 1m Essigsäure fixiert, um eine Diffusion der kleinemolekularen RNS zu verhindern.

Eingesetzt zur Elektrophorese wurde eine nach der auf Seite 7 angegebenen Methode hergestellte s-RNS. Ein Teil der RNS wurde vorher einer Hydroxylapatit-chromatographie unterzogen, der andere ohne Chromatographie eingesetzt. Bei der Hydroxylapatit-Chromatographie wurde die von den Glycoproteiden abgetrennte RNS-Fraktion im Ganzen mit 0,2n Puffer eluiert und lag nun in einer Lösung mit hoher Phosphationenkonzentration vor. Da diese Phosphationen bei der

anschließenden Elektrophorese stören würden, wird die RNS-Fraktion noch einmal einer Chromatographie über eine Sephadex-G-25 Säule unterzogen. Die s-RNS erscheint in einem Elutionsvolumen, welches dem äusseren Volumen (Gesamtvolumen -Partikelvolumen) der Säule entspricht, da die RNS nicht retiniert wird, während die Salze in die Sephadex-Partikel eindringen und deshalb in einem erheblich größeren Elutionsvolumen erscheinen. Die Fraktionen, welche die RNS enthalten, werden gesammelt und durch Gefriertrocknung eingeengt. Die Elektrophorese wird parallel in vier Röhrchen durchgeführt:

Vorelektrophorese:	45' bei 200 V und 20 mA
Elektrophorese:	30' bei 200 V und 20 mA
Substanz:	2.25µg RNS nach HP-Chrom.
	2.25µg RNS ohne HP-Chrom.
Fixierung:	15' in 1m Essigsäure

Je ein Röhrchen wird im Densitometer gemessen und in 0,2% Methylenblau für 4 Stunden gefärbt. Die densitometrische Auswertung ergab in beiden Fällen eine klare Auftrennung in drei Peaks. Der kleinste Peak ist am schnellsten gelaufen, hat demnach also das geringste Molekulargewicht.

Bei der Färbung mit Methylenblau war die anschließende Entfärbung sehr zeitraubend und gelang nicht vollständig. Es waren auf hellblauem Untergrund zwei Banden zu sehen, die sich aber nicht vollständig gegeneinander abhoben. Wegen der im Verhältnis zur densitometrischen Auswertung schlechten Auflösung und dem etwas aufwendigen Verfahren wird im folgenden der Bestimmung der UV-Extinktion der Vorzu gegeben.

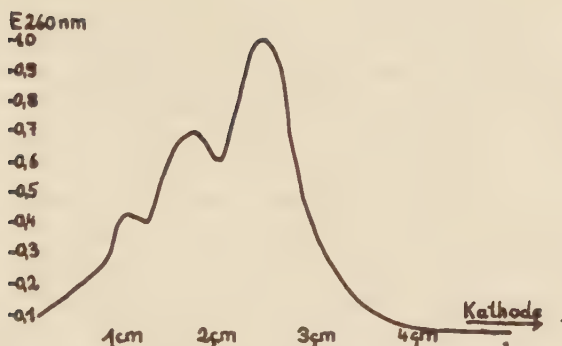


Fig.6: Densitometrische Aufzeichnung einer elektrophoretisch aufgetrennten s-RNS

Um Aufschluß über die Natur dieser drei Peaks zu bekommen, wird wiederum die Aufarbeitung der RNS so modifiziert, daß ein Abbau der RNS während der Extraktion so weit wie möglich zurückgedrängt wird. Die Aufarbeitung wurde wie folgt durchgeführt:

1. Den 11 Tage alten Embryonen werden neben den Köpfen auch die Eingeweide entfernt um die im Pankreas in hoher Konzentration vorkommende RNase auszuschalten. Anschließend werden die Embryonen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgt wie üblich bei -20°C , die weitere Aufarbeitung erfolgt spätestens am nächsten Tag.

2. Homogenisierung: Der 0,5% NaCl-Lösung wird 0,5% naphthalindisulfonsaures Natriumsalz (umkristallisiert aus H_2O , mit Alkohol nachgewaschen) zugesetzt. Die aufgetauten Embryonen werden wie üblich im Potter homogenisiert und dann zentrifugiert. Die Naphthalindisulfonsäure soll die RNase-Aktivität hemmen.

3. Phenolextraktion: Dem 80% Phenol wird 0,1% 8-Oxychinolin zugesetzt, ebenfalls um die RNase-Aktivität herabzusetzen. Parallel dazu erfolgt eine Aufarbeitung ohne diese zusätzlichen Maßnahmen, wie auf Seite 7 beschrieben. Die Aufarbeitung unter Zusatz von RNase-Hemmstoffen wird im folgenden mit A bezeichnet, die Kontrolle ohne Zusatz mit B. Beide Ansätze A und B werden wie üblich der quantitativen Elektrophorese unterzogen.

II. Modifizierung der Phenolextraktion

Die Phenolextraktion der Aufarbeitung A wurde in der Weise abgewandelt, daß die 3. Phenolextraktion nicht mehr bei $60^{\circ}C$, sondern bei Raumtemperatur durchgeführt wird, um eventuell bei $60^{\circ}C$ auftretende thermische Brüche der RNS zu vermeiden. Dem 80%igem Phenol wurde wie in Aufarbeitung A 0,1% 8-Oxychinolin zugesetzt. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung wie beschrieben.

III. Vergleichende Elektrophorese ohne und nach HP-Chromatographie

Ein Teil der Aufarbeitung A und B wurden einer Hydroxylapatit-Chromatographie (mit anschließender Chromatographie über Sephadex-G-25 und Gefrier-trocknung) unterzogen. Nach anschließender Elektrophorese wurden die Diagramme mit Elektrophoresen

ohne vorherige Hydroxylapatit-Chromatographie verglichen.

Ergebnisse:

Die densitometrische Auswertung ergab folgendes:

I. Der Vergleich der ursprünglichen Aufarbeitung B mit der modifizierten Aufarbeitung A unter Zusatz von RNase-Hemmstoffen ergab eine deutliche Verminderung des ersten, kleinmolekularen Peaks (Fig. 7a und 7b).

II. Der Vergleich der modifizierten Phenolextraktion mit dem nicht modifizierten Verfahren ergab keinen Unterschied. Die Diagramme waren nach der densitometrischen Ausmessung bei beiden Aufarbeitungen gleich und entsprechend Fig. 7b.

III. Der Vergleich der Proben, die vor der Elektrophorese einer Hydroxylapatit-Chromatographie unterworfen worden waren mit denen ohne Hydroxylapatit-Chromatographie ergab bei ersteren ein völliges Verschwinden des ersten kleinmolekularen Anteils, während bei den Proben ohne vorherige Chromatographie ein kleiner Peak übrigbleibt. Ein Teil des als Abbauprodukt anzusehenden kleinmolekularen Anteils wird also schon bei der Hydroxylapatit-Chromatographie abgetrennt.

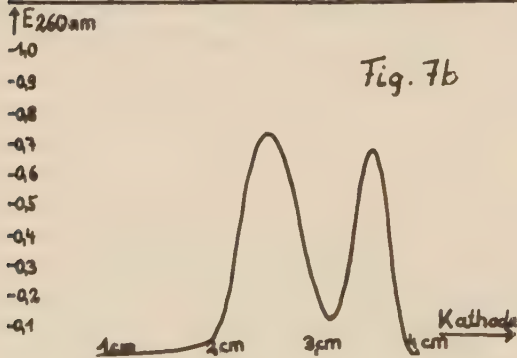
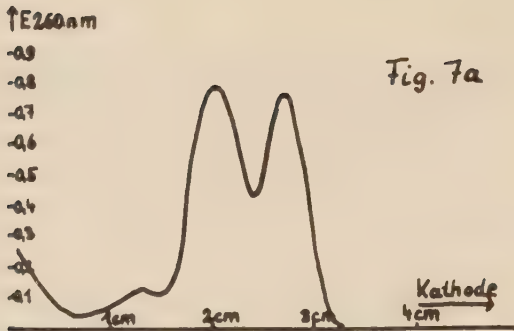


Fig. 7a: Elektrophorese einer s-RNS nach Zusatz von RNase-Hemmern ohne HP-Chromatographie

Fig. 7b: Elektrophorese derselben s-RNS nach HP-Chromatographie

Die Versuche zeigen, daß es sich bei der Auftrennung der RNS in drei Peaks bei dem schnelllaufenden kleinemolekularen Anteil in erster Linie um ein Artefakt durch Abbauvorgänge höhermolekularer RNS handelt. Die elektrophoretische Auftrennung der in der Sephadex-G-100 Chromatographie als einheitlicher Peak erscheinenden Fraktion in zwei Bestandteile bleibt bestehen, wenn bei der Gewinnung der RNS die RNasen möglichst inaktiviert waren. Es bleibt zu klären, ob es sich bei dem einen Peak nicht doch um Abbauprodukte handelt oder ob eine echte Aufspaltung einer bis jetzt als einheitlich angesehenen s-RNS-Fraktion gelungen ist.

In den weiteren Versuchen wurden die an Hydroxylapatit auftrennbaren RNS-Fractionen (nach Elution mit 0,002M, 0,01M und 0,02M Puffer) isoliert einer Elektrophorese unterworfen. Ein Zusammenhang zwischen der Auftrennung an Hydroxylapatit und der Auftrennung durch Elektrophorese ist allerdings nicht zu erwarten, da wie bereits erwähnt bei der Hydroxylapatit-Chromatographie nach der Sekundärstruktur, bei der Elektrophorese nach dem Molekulargewicht aufgetrennt wird. Außerdem hatten die bereits beschriebenen Versuche ergeben, daß die Auftrennung an Hydroxylapatit ein eher zufälliges Ergebnis zu sein scheint, das von der Wahl des Puffers, der Molaritäten des Elutionspuffers, dem Verhältnis Beladung/Bettvolumen und anderen Variablen abhängig ist. Die isolierte Elektrophorese des Peaks II und Peaks III der Hydroxylapatit-Chromatographie (nach 18-stündiger Dialyse im Viskose-Schlauch gegen 0,5% NaCl zur Entfernung der Phosphationen) ergab dann auch in beiden Fällen wiederum eine Auftrennung in die zwei bekannten Peaks (Fig. 8a und b).

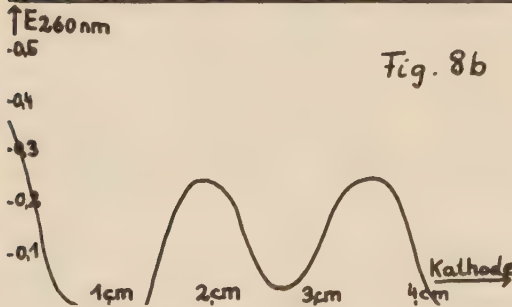
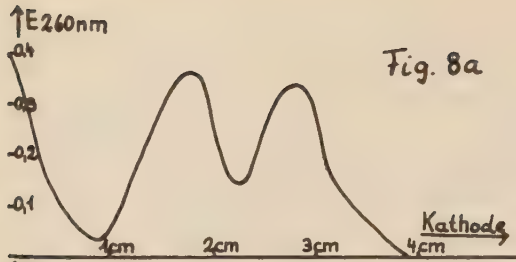


Fig.8a: Elektrophorese des Peak II der HP-Chromatographie

Fig.8b: Elektrophorese des Peak III der HP-Chromatographie

Eine andere Möglichkeit, die Natur dieser in zwei unbekannte Bestandteile aufspaltbaren s-RNS zu untersuchen, ist der Vergleich mit bekannter reiner t-RNS und mit Mononukleotiden. (Definierte Oligonukleotide standen für die Untersuchungen leider nicht zu Verfügung.)

In sechs Röhren werden nebeneinander angesetzt:

1. 20 μg s-RNS, hergestellt nach S.21, nach HP-Chromatographie.
2. 20 μg t-RNS aus Bäckerhefe (Boehringer)
3. 1+2 gemischt, und zwar 15 μg von 1 und 5 μg von 2
4. 20 μg NAD^+ (Boehringer)
5. 20 μg ATP (Boehringer)
6. Leerwert

Durch die Elektrophorese der käuflichen t-RNS wird gezeigt, daß es sich tatsächlich um eine einzige, nicht aufspaltbare Fraktion handelt. (Fig.9) Das Gemisch der zu untersuchenden s-RNS-Fractionen mit der Hefe t-RNS zeigt, im Gegensatz zu der alleinigen Elektrophorese der s-RNS (Fig.11) eine deutliche Erhöhung des letzten Peaks, des höhermolekularen Anteiles (Fig.11). Dieser Peak kann somit als t-RNS angesehen werden, während dieser Versuch über die Natur des kleinemolekularen Anteils nichts aussagt. Die Elektrophorese der Mononucleotide ergab das gleiche Bild wie der Leerwert, sie dürften also unter diesen Bedingungen bereits aus dem Gelröhrchen herausgewandert sein.

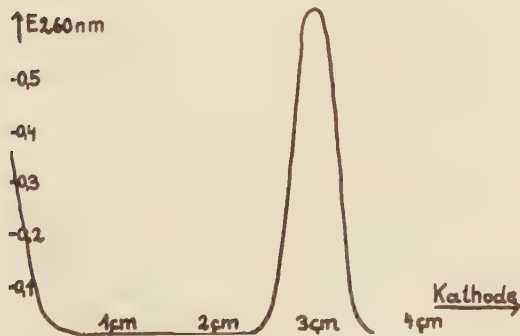


Fig. 9: Elektrophorese einer reinen t-RNS aus Bäckerhefe

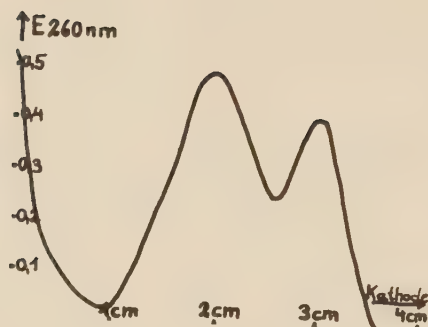


Fig. 10: Normale Auftrennung der s-RNS

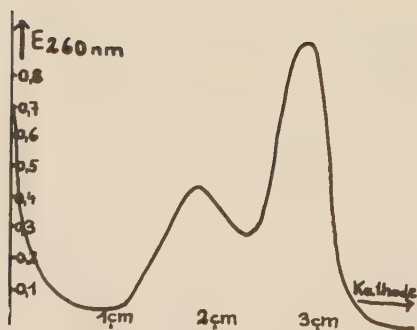


Fig. 11: Gemisch von t-RNS aus Bäckerhefe und der s-RNS

4.b. Präparative Trennung bei der Polyacrylamid-Elektrophorese

Um den letzten Peak in der elektrophoretischen Auftrennung sicher als t-RNS identifizieren zu können, muß man nun seine biologische Transfer-Aktivität testen. Dazu braucht man eine Methode, die beiden Anteile quantitativ und fraktioniert aus dem Trenngel zurückzugewinnen. Es sind von mehreren Autoren (26-30) Methoden und Apparate beschrieben worden, um aus den analytischen Gelröhrchen die aufgetrennten Bestandteile zu isolieren und ihre Radioaktivität zu messen. Die Methoden beruhen in der Mehrzahl darauf, daß die Gelröhrchen (z.T. nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff) mittels eines besonderen Schneidesystems in beliebig dicke Scheiben geschnitten werden, aus denen die Substanz eluiert und der Radioaktivitätsmessung zugeführt wird. Bei diesem Verfahren ist jedoch nur eine geringe Beladung möglich, wenn man eine scharfe Auftrennung erreichen will. Um eine etwas höhere Beladung zu erreichen, habe ich 10cm lange Röhrchen verwendet, die mit einem Kühlmantel umgeben waren, um die Joule'sche Wärme abzufangen, die unter diesen Bedingungen vermehrt auftritt. Mit 10cm langen Gelröhrchen ist eine Beladung von 50-75µg RNS möglich. Nach der Elektrophorese werden die unfixierten Gele in 0,25cm lange Scheiben geschnitten, aus denen die RNS mit 0,5ml 0,5%iger NaCl-Lösung eluiert wird. Die Konzentration der RNS im Eluat wird dann im Photometer gemessen.

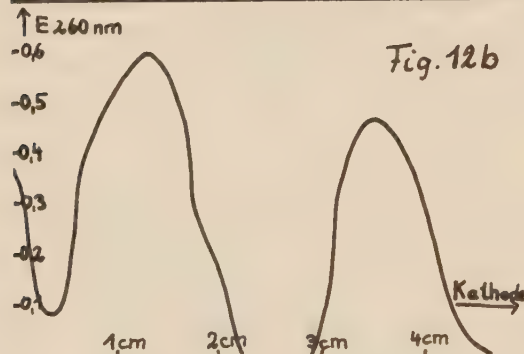
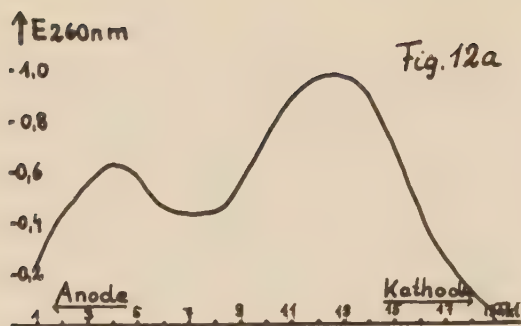


Fig. 12a: Densitometrische Auswertung der Fraktionen nach Elution aus 0,25cm dicken Scheiben. Ausgewertet wurden nur die Fraktionen der Anoden-nahen Hälfte. Zählung vom Anodenende.

Fig. 12b: Densitometrische Auswertung des intakten Gelröhrchens. Anoden-nahe Hälfte.

Mit einer Beladung von etwa 75 μ g RNS ist dem Verfahren der direkten Elution aus analytischen Gelen eine Grenze gesetzt und die Konzentration der aufgetrennten und isolierten Bestandteile ist immer noch zu niedrig, als daß man damit eine exakte Transfer-Aktivitätsbestimmung durchführen könnte. Für die präparative Auftrennung größerer Substanzmengen stehen verschiedene aufwendigere Apparate zur Verfügung. HAUSSCHILD-ROGAT und IVOR SMITH (31) beschreiben ein Verfahren, bei dem bis zu 60 mg Protein aufgetrennt werden kann. BROWNSTONE (32) gibt für seinen Apparat eine Beladung bis zu 500 mg Protein an. Da bei der analytischen Methode die Beladung mit s-RNS, die zu einer guten Auftrennung führt, um einen beachtlichen Teil kleiner ist als bei der elektrophoretischen Proteinauftrennung, wird auch die maximale Beladung der präparativen Elektrophoreseapparate mit RNS weit unter den angegebenen Werten liegen.

Von mir wurde der Fraktophorator von "Buchler Instruments" benutzt, der mit einem automatischen Fraktionssammler verbunden wurde. Die Einstellung des Fraktionssammlers war gekoppelt mit dem Wechsel der Elutionsflüssigkeit am Fraktophorator. Bei diesem Elektrophoreseapparat (Fig. 13) treten die im Laufe der Elektrophorese aufgetrennten Banden kontinuierlich in das Elutionsgefäß am Anodenende der Gelsäule über, wo sie von einer genau abgemessenen Puffermenge aufgefangen werden. In regelmäßigem Abstand wird der Puffer aus dem Elutionsgefäß in die Reagenzgläser des Fraktionssammlers entleert.

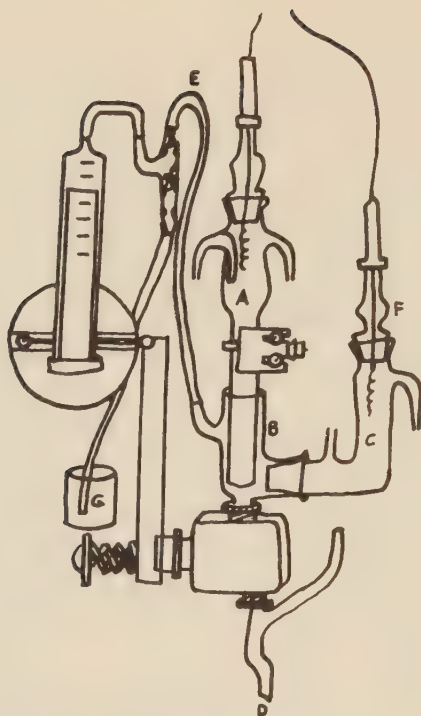


Fig. 13: Schema des Fraktophorators von Buchler

A: Elektrophoresesäule mit Gel

B: Elutionspuffergefäß

C: Untere Elektrodenkammer (=Anoden-
seite)

Die Verbindung zum Puffergefäß
ist mit Dialysierschlauch ver-
schlossen.

D: Ausfluß zum Fraktionssammler

E: Zweiwegeventil: Beim Abwärtsbe-
wegen des Spritzenstempels wird
Puffer aus dem Vorratsgefäß an-
gesaugt und beim Aufwärtsbewegen
in das Elutionsgefäß entleert.

F: Kathode

G: Vorratsgefäß

Präparative Elektrophorese:

Puffer: nach Peacock und Dingmann S. 17

+ 0,2% Sodiumdodecylsulfat

Säule: 8cm; 10%iges Gel

Beladung: 0,6mg -RNS in 0,7 ml NaCl-Lsg

+ 10% Sach.

Vorelektrophorese: 2 Stunden

Elektrophorese: 260 V; 40 mA

Elutionsvolumen: 1,2 ml

Fraktionssammler: 15 Fraktionen/2 Stunden

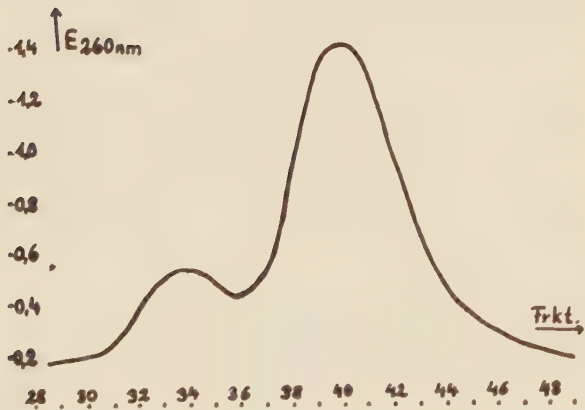


Fig. 14: Präparative Auftrennung der s-RNS im Fraktophorator.

An dem Diagramm fällt im Vergleich zur analytischen Auftrennung das veränderte Verhältnis zwischen dem zuerst eluierten Peak I zum Peak II auf (Fig. 14). Dieses Verhältnis war bei allen Versuchen zur präparativen Trennung der RNS etwa gleich.

5. Bestimmung der Transfer-Aktivität

Nach der präparativen Auftrennung der s-RNS-Fraktion im Fraktophorator werden die Fraktionen, in denen die beiden Peaks erscheinen, mit einem Alkohol/Äther-Gemisch im Verhältnis 3:1 gefällt. Der Niederschlag wurde in 0,7 ml 0,5% NaCl gelöst; davon wurden jeweils 0,4 ml für den Versuch eingesetzt.

Nach einer von GOTTSCHLING ausgearbeiteten Methode (33) wird die Einbaurrate für Aminoacylreste mit einem Gemisch aus 15 markierten Aminosäuren ($\sum_{15} \text{AA}$) getestet. Der Einbau wird eindeutig nur durch die RNS im Peak II stimuliert (Fig. 15).

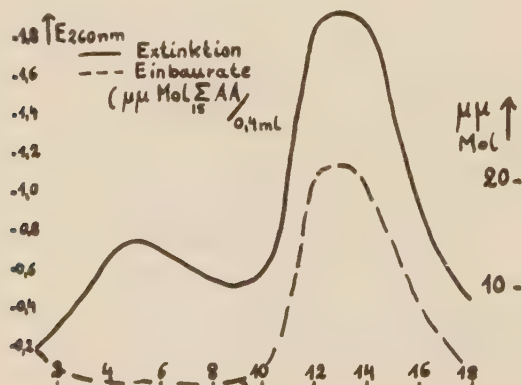


Fig. 15: Beziehung zwischen Extinktion der aufgetrennten s-RNS Fraktion und Einbaurrate von Aminoacylresten.

6. Isolierung einer RNS-Fraktion unter Zusatz hochmolekularer RNS

Um zu entscheiden, ob der Peak I ein Abbauprodukt höhermolekularer RNS ist, welches bei der Aufarbeitung entsteht oder eine in den Embryonen schon vorhandene RNS-Fraktion darstellt, wurde eine Aufarbeitung durchgeführt, zu der hochmolekulare, radioaktiv markierte RNS zugesetzt wurde. Die isolierte RNS wurde dann elektrophoretisch getrennt. Dem Versuch liegt folgender Gedankengang zu Grunde: Wird während der einzelnen Aufarbeitungsschritte hochmolekulare RNS in größerem Umfang abgebaut, so muß auch den Hühnerembryonen zusätzlich beigefügte hochmolekulare RNS in dem gleichen Umfang abgebaut werden. Ist diese zugesetzte RNS radioaktiv markiert, so werden also radioaktive Bruchstücke im Peak I erscheinen und können gemessen werden. Voraussetzung für diesen Versuch ist:

1. Die Herstellung einer radioaktiv-markierten hochmolekularen RNS aus Hühnerembryonen.
2. Die quantitative Auftrennung der isolierten s-RNS-Fraktion, so daß die Fraktionen getrennt im Scintillationszähler gemessen werden können.

Zu 1) Herstellung und Markierung hochmolekularer RNS. Es sind verschiedene Methoden zur Markierung von RNS bekannt. In Frage kommen zum Beispiel der Austausch von Wasserstoff gegen Tritium (34) oder der biosynthetische Einbau von markierten Chloriden (35). Die schnellste und einfachste Methode ist aber die Methylierung mit Dimethylsulfat (36-39), wobei sowohl C^{14} - als auch H^3 -markiertes Dimethylsulfat verwandt werden kann. POCHON und MICHELSON (38) konnten zeigen, daß unter bestimmten Bedingungen die Methylierung

der RNS und DNS mit Dimethylsulfat immer am N des Guanins erfolgt. Eine bevorzugte Methylierung einer bestimmten RNS-Art wurde nicht beobachtet (SMITH, K. 36).

Methode zur Isolierung und Markierung der hochmolekularen RNS

75g 11 Tage alte Hühnerembryonen wurden nach Entfernung von Kopf und Eingeweiden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen wurden sie wie üblich in dem doppelten Volumen 0,5% NaCl + 0,5% naphthalindisulfonsaures Natrium-Salz homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 2500 RpM zur Abtrennung der Kerne (Kontrolle unter dem Mikroskop) wird der Überstand 2 Stunden bei 38000 RpM zentrifugiert. Das Sediment wird in 70 ml 0,5% NaCl aufgenommen und einer Phenolextraktion unterzogen mit einem Volumen 80% Phenol + 0,1% Oxychinolin (5 Minuten bei 60 Grad C). Nach Zentrifugation (15 Minuten bei 20000 RpM) wird die wässrige Phase mit zwei Volumen 96%igem Alkohol gefällt, gewaschen und in 9 ml 0,5% NaCl-Lösung gelöst. Die Ausbeute nach Messung der UV-Extinktion bei 260nm beträgt 54 mg. Diese werden mit RNase-freier DNase (Boehringer) behandelt. Pro mg RNS werden etwa 15 ug DNase benötigt.

Ansatz: 54mg RNS in 54ml

0,8mg DNase in 8ml

0,65ml MgCl_2 -Lösung 1m (Endkonzentration $10^{-2}\text{M}/1$)

Es wurde 60 Minuten bei 37 Grad C inkubiert, mit einem Volumen 80%igem Phenol extrahiert, die wässrige Phase in Alkohol gefällt und in NaCl gelöst.

Die Ausbeute beträgt 28mg. Zur Abtrennung der abgebauten DNS-Bruchstücke folgt eine Sephadex-G-100 Chromatographie, der Ausschlußpeak wird gesammelt und noch einmal mit Alkohol umgefällt. (Ausbeute: 23,2mg)

Die gereinigte hochmolekulare RNS aus Hühnerembryonen wird mit C^{14} -Dimethylsulfat (spez. Aktivität: 40mCi/mMol) methyliert. Eingesetzt werden 0,1mCi C^{14} -Dimethylsulfat.

Die Methylierung wird nach einem Verfahren von CRIPPA und GROSS (37) durchgeführt, das von mir etwas modifiziert wurde: Zu 0,1mCi Dimethylsulfat werden 7mg RNS in 0,5ml NaCl-Lösung und 0,5ml 0,1m Phosphatpuffer (pH 7) zugefügt und 20 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die RNS zweimal mit 66%igem Alkohol gefällt, ausgiebig gewaschen und in NaCl gelöst, so daß die Konzentration 1mg RNS/ml betrug.

Zur Messung der Radioaktivität im Scintillationszähler werden die Proben folgendermaßen vorbereitet:

- 10µl (=10µg) RNS
- 100µl (=0,3mg) Albuminlösung
- 100µl 0,5% NaCl
- 50µl 30% Trichloressigsäure
(Endkonzentration 5%)

Die Albuminlösung wird zugegeben, damit durch das ausfallende Eiweiß die geringe Menge RNS mitgerissen und quantitativ ausgefällt wird. Der Niederschlag wird 10 Minuten stehen gelassen, zweimal mit 5% Trichloressigsäure gewaschen, 5 Minuten im Exsikkator getrocknet und in 0,5ml Hyamin gelöst (notfalls in ein Wasserbad von 50°C stellen bis zur vollständigen Lösung). Die Lösung wird mit 10ml Scintillationsflüssigkeit (4g Omnifluor auf 1 Toluol) in die Scintillationsgefäße gespült.

Messung im Scintillationszähler (BECKMANN)

	CpM	%Fehler
0-Wert	15	15
10*10ug	3683	1
15*10ug	5071	1

Präparationen für s-RNS-Fraktion nach Zusatz von hochmolekularer markierter RNS:

Zur Durchführung der Versuche wird die C^{14} -RNS mit der spezifischen Aktivität von 368 CpM/ug in wechselndem Verhältnis einer normalen Aufarbeitung von Hühnerembryonen zugesetzt:

1. 20g Hühnerembryonen (präpariert wie S.21)
1mg C^{14} -RNS

Nach dem oben beschriebenen Extraktionsverfahren betrug die Ausbeute an RNS 1,6mg.

2. 10g Hühnerembryonen (präpariert wie S.21)
2mg C^{14} -RNS

Die Gesamtausbeute an RNS betrug 0,8mg.

Die markierte RNS wird den präparierten Hühnerembryonen direkt vor der Homogenisierung zugegeben. Die Aufarbeitung erfolgt wie üblich (S.21). Jeweils die Hälfte der Aufarbeitung 1 (20/1) und 2 (10/2) werden einer Hydroxylapatitchromatographie unterzogen, die andere Hälfte direkt im Scintillationszähler gemessen. Alle Proben werden wie oben beschrieben zur Scintillationszählung vorbereitet.

	CpM	%Fehler
Leerwert	11	15
1.Probe 20/1 ohne HP(10ug)	40,4	7
1.Probe 20/1 nach HP(10ug)	43,3	7
2.Probe 10/2 ohne HP(10ug)	114,4	5
2.Probe 10/2 nach HP(10ug)	119,5	5

Wegen Materialmangel werden beide Anteile der Aufarbeitung 10/2 gesammelt, aus Alkohol umgefällt und der präparativen Elektrophorese unterzogen. Die Fraktionen, in denen die in zwei Peaks aufgetrennte RNS erscheint, werden im Scintillationszähler gemessen. Die Auswertung ergab eine deutliche Anhäufung der Aktivität in den Fraktionen, in denen der Peak I erscheint (Fig. 16).

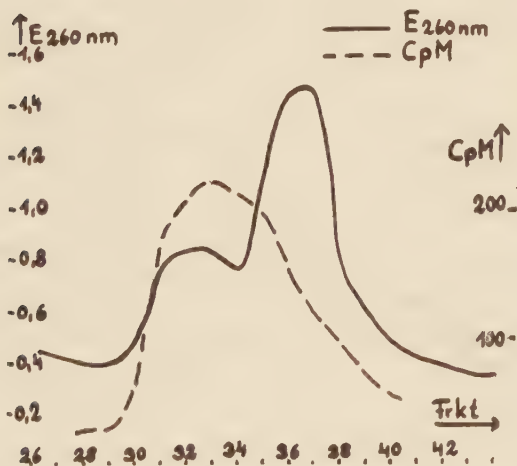


Fig. 16: Verteilung der Radioaktivität aus der C^{14} RNS in der präparativ aufgetrennten s-RNS.

— Extinktion
 --- CpM

Vergleichend wird noch einmal eine Auftrennung in 10cm langen analytischen Gelröhrchen durchgeführt, die mit 60ug s-RNS des Ansatz 10/2 beladen wurden. Das Schneiden und die weitere Bearbeitung erfolgte wie auf S.29 angegeben. Danach wird die RNS mit Trichloressigsäure unter Zuhilfenahme von Albumin gefällt und wie üblich zur Scintillationsmessung vorbereitet. Das Diagramm zeigt im Prinzip das gleiche Ergebnis wie bei der präparativen Auftrennung.

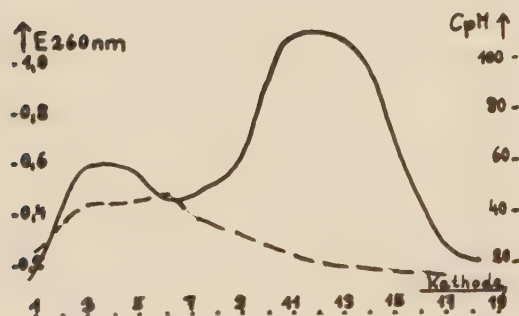


Fig. 17: Auftrennung von 60ug s-RNS in 10cm langen Röhrchen. Elution aus 0,25cm dicken Scheiben der Anoden-nahen Hälfte. Nummerierung vom Anodenende.

—— Extinktion
 ---- CpM

Es werden noch zwei Kontrolluntersuchungen durchgeführt:

1. Nach Zentrifugation bei 105000·g wird im Rückstand von Ansatz 1 (20/1) die Radioaktivität bestimmt. Es zeigt sich, daß wie zu erwarten der Hauptanteil der eingesetzten RNS im Rückstand wiedergefunden wird.

Der Rückstand des 20/1-Ansatzes wird in 10ml 0,08m NaCl aufgenommen und die ungelösten Partikel durch Zentrifugieren bei 3000 RpM (10 Minuten) abgetrennt. Im Überstand wird nach Bestimmung der Konzentration der RNS durch Messung der Extinktion bei 260nm die Aktivität im Scintillationszähler gemessen.

Ausbeute: 25mg RNS

Spez.Akt: 132 CpM/10ug RNS

Wenn 10ug RNS eine Aktivität von 132 CpM haben, dann haben die 25mg RNS, die als Ausbeute erhalten wurden, insgesamt eine Aktivität von $132 \cdot 2500 = 330000$ CpM. In dem 1mg hochmolekularer markierter RNS, die dem Ansatz 20/1 zugesetzt worden war, war eine Gesamtaktivität von 368300 CpM. Von diesen 368300 CpM erscheinen zirka 330000 CpM, also mindestens 90% im Rückstand des Ansatzes.

2. Es wurde geprüft, ob die eingesetzte hochmolekulare RNS tatsächlich nur hochmolekulare Anteile enthält, oder ob in ihr schon die Bruchstücke vorhanden sind, die schließlich als Peak I der s-RNS-Fraktion erscheinen. Die hochmolekulare RNS wurde deshalb einer Elektrophorese unterworfen, wobei aber zu beachten ist, daß die insgesamt eingesetzte Menge so groß sein muß, daß die 1-2%, die allenfalls als niedermolekularer Bestandteil erwartet werden, noch erfaßt werden können. Aus diesem Grunde eignet sich

die qualitative Auftrennung in den Gelröhrchen nicht, da bei einer so massiven Beladung von zirka 1mg RNS, die nötig ist, um 10ug niedermolekulare Bruchstücke in Erscheinung treten zu lassen, keine klare Aussage erwartet werden kann.

16mg RNS aus der Aufarbeitung von S.35, die nicht der Methylierung mit Dimethylsulfat unterzogen wurden, werden der präparativen Elektrophorese unterworfen. Die Ausmessung der Fraktionen ergab keinen Anstieg der Extinktion in den Eluaten, die dem Peak I entsprechen. Die hochmolekulare RNS ist zu groß, als daß sie in dem feinmaschigen Netz eines 10%igen Polyacrylamidgels in annähernd der Zeit wandern könnte, die für die s-RNS in Frage kommt. Andere, kleinmolekulare Anteile sind offenbar in der Fraktion nicht erhalten. Dabei wird allerdings vorausgesetzt, daß bei der Dimethylsulfatbehandlung der RNS kein Abbau stattfindet.

C. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte den Zweck, an Hand von verschiedenen Trennmethoden die Zusammensetzung einer s-RNS-Fraktion zu prüfen. Zur Gewinnung dieser Fraktion wurden Hühnerembryonen homogenisiert, aus dem Homogenat wurde dann durch Zentrifugieren bei 105000·g die hochmolekularen Bestandteile und durch Phenolextraktion die Proteine abgetrennt. Die Fraktion zeigte nach dem Homogenisieren, hochtourigem Zentrifugieren und zwei Phenolextraktionen bei der Chromatographie an einer Sephadex-G-100 Säule eine Auftrennung in drei Peaks. Nach Erweiterung der Aufarbeitung durch eine dritte Phenolextraktion verschwand der erste Peak, der nach seinem Elutionsverhalten das höchste Molekulargewicht hatte. Er enthielt also möglicherweise noch Proteine, die erst nach der dritten Phenolextraktion vollständig in die Phenolphase übergegangen waren. Es interessieren also die beiden letzten Peaks, die bei der Extinktionsmessung ein RNS-Spektrum aufweisen. Es sollte ein Weg gefunden werden, die Natur dieser beiden Bestandteile der s-RNS-Fraktion zu klären.

Die Fragestellung ist also: Handelt es sich um die Auftrennung einer bisher als Einheit angesehenen transfer-RNS-Fraktion in zwei biologische Bestandteile oder stellt ein Peak ein während der Aufarbeitung entstandenes Abbauprodukt höherer Ribonukleinsäuren dar? Durch Modifikation der Aufarbeitungsbedingungen und Auftrennung an Sephadex-G-100 Säulen konnte gezeigt werden:

1. Unter Bedingungen, die im Homogenat den RNS-Abbau begünstigen, vergrößert sich eindeutig der An-

teil des Peaks, der dem kleineren Molekulargewicht entspricht, während er bei sehr sorgfältiger und schneller Aufarbeitung kaum sichtbar ist. Nach Abtrennung der Proteine durch Phenolextraktion verändert auch einstündige Inkubation der Probe bei 37 Grad C das Elutionsprofil praktisch nicht. Daraus läßt sich folgern: Bei den an Sephadex-G-100 Säulen aufgetrennten Anteilen enthält der Peak mit dem höchsten Molekulargewicht Proteine, die bei nochmaliger Phenolextraktion in die Phenolphase übergehen. Die Komponente mit dem geringsten Molekulargewicht enthält ein RNS-Abbauprodukt.

2. Bei Auftrennung der RNS an verschieden langen Sephadex-G-100 Säulen verändert sich das Verhältnis der aufgetrennten Komponenten. Bei der sehr lang dauernden Auftrennung an der 2m-Säule war eine Komponente beinahe verschwunden, während sie bei der 48cm-Säule etwa einem Drittel der insgesamt eluierten RNS entsprach. Die Ursache dafür wurde nicht geklärt. Es kann diskutiert werden, ob hier ähnliche Verhältnisse vorliegen, wie sie von ZACCHAU (13) bei der Chromatographie von Nukleinsäuren und Nukleotiden gefunden wurden. ZACCHAU beschreibt in seiner Arbeit über die Sephadex-Chromatographie der löslichen RNS und seiner Spaltprodukte, das letztere, obwohl sie nur etwa 1/10 der Kettenlänge der s-RNS besitzen, nur wenig später eluiert werden als die s-RNS. Er schließt daraus, daß "unter den Chromatographie-Bedingungen die s-RNS-Moleküle durch Spiralisierung bzw. Faltung "kleiner" und/oder die Oligonukleotide durch Aggregation "größer" zu sein scheinen". Chromatographie in Gegenwart von Harnstoff beeinflußt sowohl bei ZACCHAU als auch in eigenen Versuchen das Elutionsverhalten nicht.

Entsprechend ZACCHAUS Erfahrungen könnte man annehmen, daß sich in Abhängigkeit von der Dauer der Chromatographie die Molekülgrößen einander "annähern" und demnach der Anteil an Oligonukleotiden, der als isolierter Peak eluiert wird, scheinbar kleiner wird. Dieser Effekt wäre besonders bei der langdauernden Chromatographie an der 2m-Säule zu erwarten.

Bei der Auftrennung an Hydroxylapatit traten ebenfalls Komponenten auf, die je nach Elutionsbedingungen in ihrem Verhältnis zueinander stark variierten. Diese Trennung ist aber nicht mit der Auftrennung an Sephadex-Säulen zu vergleichen. Während die Auftrennung an Sephadex-Säulen nach dem Molekulargewicht erfolgt, ist bei der Hydroxylapatit-Chromatographie das Elutionsverhalten wahrscheinlich von der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der RNS abhängig. Durch die Wahl verschiedener Konzentrationen des zur Elution verwendeten Phosphatpuffers kann das Elutionsprofil beinahe beliebig variiert werden. Die Hydroxylapatit-Chromatographie ist also nicht geeignet, eine Aussage über die Einheitlichkeit einer RNS-Fraktion in Bezug auf das Vorhandensein von verschieden großen Molekülen zu machen.

Hiefür bietet sich ein anderes Verfahren an, die Elektrophorese in Polyacrylamidgelen. Auf Grund des Molekularsiebeffektes werden Nukleinsäuren sehr viel besser aufgetrennt, als nach den herkömmlichen Chromatographieverfahren möglich ist. Durch Elektrophorese in einem analytischen Gel konnte eine Auftrennung der bei der Sephadex-Chromatographie einheitlich erscheinenden RNS in zwei Peaks erreicht werden. Nach einer Aufarbeitungsmethode, bei der die RNase-Aktivität soweit wie möglich zurückgedrängt wird, verschwand

der kleinmolekulare Peak, während die beiden anderen unverändert blieben. Durch vergleichende Elektrophorese mit bekannter reiner t-RNS und durch Testung der biologischen Transfer-Aktivität konnte der Peak II als t-RNS identifiziert werden. Durch Kontrollversuche mit radioaktiv markierter hochmolekularer RNS konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem Peak I wahrscheinlich um Abbauprodukte hochmolekularer RNS handelt. C^{14} markierte hochmolekulare RNS aus Hühnerembryonen wurde der Aufarbeitung vor dem Homogenisieren zugesetzt und das Auftreten der Radioaktivität und deren Verteilung auf die zwei fraglichen Peaks gemessen. Diese Versuche führten zu folgendem Ergebnis: Die zugesetzte C^{14} -RNS hat eine spezifische Aktivität von 368 CpM/ug. Bei einem Zusatz von 2mg C^{14} -RNS zu 10g Hühnerembryonen beträgt die Gesamtktivität 740000 CpM. Die Aktivität der isolierten s-RNS beträgt nach Abzug des Nullwertes 10,5 CpM/ug. Bei einer Ausbeute an s-RNS von 0,8mg erscheinen also von den zugesetzten 740000 CpM $10,5 \cdot 800 = 8400$ CpM entsprechend 1,15% in der s-RNS-Fraktion. Von der hochmolekularen C^{14} -RNS, die vor dem Homogenisieren in dem Ausgangsprodukt enthalten ist, erscheinen also 1,15% als niedermolekularer Bestandteil in der s-RNS-Fraktion. Wenn ein Teil der s-RNS-Fraktion Abbauprodukt ist, müßte der gleiche Anteil der ursprünglich im Homogenat vorhandenen hochmolekularen RNS in dieser Fraktion erscheinen. Der auf den ersten Blick klein erscheinende Wert von 1,15% erhält ein anderes Gewicht, wenn man an die relativ großen Mengen hochmolekularer RNS denkt, die in dem Ausgangsprodukt enthalten sind. Aus 10g Hühnerembryonen wurden 12,5g hochmolekulare RNS isoliert, von denen 1,15% = 0,15mg in der s-RNS-Fraktion erscheinen würden. Bei einer

Gesamtausbeute von 0,8mg s-RNS-Fraktion aus 10g Hühnerembryonen entspricht das einem Anteil von zirka 20%. Da weder von der Rückstands-RNS noch von der niedermolekularen RNS 100% isoliert werden, ist dieser Wert von 20% nur als approximativ anzusehen. Der Wert von 20% liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie dem bei der präparativen Auftrennung erzielten Verhältnis der beiden Anteile. In nicht markierter hochmolekularer RNS wurde bei der elektrophoretischen Auftrennung kein kleinmolekularer Bestandteil gefunden; es wäre aber doch möglich, daß die niedermolekulare s-RNS-Fraktion außer Spaltprodukten, die bei der Aufarbeitung entstehen, noch Anteile enthält, die im Embryo physiologisch vorhanden sind. Hierbei könnte es sich vielleicht um Polynukleotide handeln, die beim sogenannten "Processing" der heterogenen Kern-RNS entstehen. Diese "physiologischen" Spaltprodukte würden sich im Homogenat im Überstand befinden und nicht in der aus dem Sediment gewonnenen Rückstands-RNS.

Bei der analytischen Trennung und der präparativen Gewinnung der beiden Fraktionen ergaben sich folgende Unterschiede:

1. Die Schärfe der Auftrennung ist bei der analytischen Methode erheblich größer.
2. Das Verhältnis der beiden aufgetrennten Peaks ist bei der densitometrischen Ausmessung der analytischen Gele ein anderes als bei der Ausmessung der im Fraktrophorator präparativ aufgetrennten Fraktionen. In den analytischen Gelen erscheint der Peak I (besonders kleinmolekulare RNS) größer als Peak II, während nach der präparativen Elektrophorese Peak I nur etwa $1/3$ bis $1/4$ des zweiten

Peaks ausmacht. Es handelt sich also dem Anschein nach um ein ähnliches Phänomen wie bei der Auftrennung an verschiedenen langen Sephadex-Säulen beachtet wurde: Je länger die Auftrennung dauert, desto kleiner erscheint der niedermolekulare Anteil. Gegen diese Interpretation spricht aber die Tatsache, daß bei der Elution der analytisch aufgetrennten Peaks aus den in Scheiben geschnittenen Gelen und der Ausmessung der Eluate im Fotometer eine etwa gleiche Verteilung der Peaks wie bei der präparativen Elektrophorese erscheint. Es ist also eher wahrscheinlich, daß dieser Unterschied auf irgendeine Weise mit der Methode der densitometrischen Ausmessung zusammenhängt.

Neben der Isolierung der aufgetrennten RNS mit dem Fraktophorator wurde versucht, durch direkte Isolierung aus den analytischen Gelen die RNS in solchen Mengen zurückzugewinnen, daß Messung der Radioaktivität möglich ist. Eine solche Methode hat den Vorteil, daß sie schneller durchzuführen ist. Da bei der Verwendung der üblichen 5cm langen Gelröhrchen die Beladung mit RNS, die zu einer guten Auftrennung führt, sehr gering ist, wurden 10cm lange Röhrchen eingesetzt. Damit gelingt es bei einer Beladung von 60µg s-RNS die Bestandteile in einer Konzentration zu isolieren, die noch eine Bestimmung der Radioaktivität erlaubt.

Aus diesen Ausführungen ergibt sich zusammenfassend:

1. Ein Vergleich der Auftrennung durch Chromatographie an Sephadex-G-100 und Elektrophorese in Polyacrylamid zeigt die Überlegenheit der elektrophoretischen Methode. Während bei der Sephadex-Chromatographie ein weitgehend einheitlicher Peak erscheint,

gelingt es durch die Elektrophorese diesen Peak in zwei Bestandteile zu zerlegen und durch Elution aus einem analytischen Gel oder mit einem präparativen Elektrophoreseapparat zu isolieren.

2. Bei der Isolierung von s-RNS aus Hühnerembryonen, die unter weitgehenden Vorsichtsmaßnahmen (Einfrieren in flüssigem Stickstoff, Zusatz von 8-Oxycholin und Naphtalindisulfonsäure zu den verschiedenen Aufarbeitungsschritten) durchgeführt wird, erscheint immer noch ein niedermolekularer Anteil, der nicht t-RNS darstellt. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich mindestens zum Teil um Abbauprodukte der hochmolekularen RNS.

Literatur - Verzeichnis

1. Tiedemann, H., Accademia nazionale dei Lincei, Quaderno Nr. 104 (1967) 221
2. Tiedemann, H., Verhandl.Schweiz.Naturforsch. Ges. Separatdruck (1969) 32
3. Tiedemann, H., Verh.Detsch.Zool.Ges. (1967) 59
4. Tiedemann, H., J.Cell.Physiol. 72 (1968) 129
5. Tiedemann, H., Tiedemann, H.u.Born, J., Scienne 164 Nr.3884 (1969) 1175
6. Tiedemann, H., u.Tiedemann, H., Physiol.Chemie 306 (1956) 132
7. Schuster, H., Schramm, G.u.Zillig, W., Z.Naturforsch. 11b (1956) 339
8. Kirby, K.S., Biochem.J. 64 (1956) 405
9. Westphal, O., Lüderitz, O., Eichenberger, E.u. Keiderling, W., Z.Naturforsch. 7b (1962) 536
10. Porath, J. u.Flodin, P. Nature Vol. 183 (1959) 1657
11. Broschüren der Firma Pharmacia, Uppsala
12. Whitaker, J.R., Anal.Chem. 35 (1963) 1950
13. Zacchau, H.G., Biochim.Biophys.Acta 108 (1965) 355
14. Bernardi, G., Biochim.Biophys.Acta 174 (1969) 423
15. Bernardi, G., Biochim.Biophys.Acta 174 (1969) 435
16. Bernardi, G., Biochim.Biophys.Acta 174 (1969) 449
17. Chevalier, M.R., u.Bernardi, G., J.Mol.Biol. 32 (1968) 437
18. Pearson, R.L. u.Kelmers, A.D., J.Mol.Biol. 241 (1966) 767
19. Muench, K.H., u. Berg, P., Biochemistry 5 (1966) 982
20. Hartmann, G. u. Coy, U., Biochim.Biophys.Acta 47 (1961) 612

21. Spiro, R.G., Colowick, Kaplan: Methods in Enzymology VIII (1966) 3
22. Born, J., Tiedemann, H. u. Tiedemann, H., Biochim. Biophys. Acta 279 (1972) 175
23. Ornstein, L., Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964) 321
24. Davis, B.J., Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964) 404
25. Richards, E.G., Coll, J.A. u. Gratzner, W.B., Anal. Biochem. 12 (1965) 452
26. Richards, E.G., u. Gratzner, W.B., Nature 204 (1964) 878
27. Ivor Smith, Chromatographic and Electrophoretic Techniques. W. Heinemann: Medical Books (1968), Chapter II, Richards, E.G. u. Gratzner, W.B.
28. Peacock, A.C. u. Dingman, W.C., Biochemistry, 6 Nr. 6 (1967) 1818
29. Loening, U.W., Biochem. J. 102 (1967) 251
30. Maizel, J.v., Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964) 882
31. Ivor Smith, Chromatographic and Elektrophoretic Techniques. W. Heinemann: Medical Books (1968), Chapter 13, Section 1, Hausschild-Rogat, P. u. Smith, I.
32. Ivor Smith, Chromatographic and Elektrophoretic Techniques. W. Heinemann: Medical Books (1968), Chapter 13, Section 2, Brownstone, A.
33. Wittig, B., Reuter, S. u. Gottschling, H. Biochim. Biophys. Acta 331 (1973) 221
34. Borenfreund, E., Rosenkranz, M.S. u. Bendich, A., J. Mol. Biol., 1 (1959) 195
35. Ascoli, F. u. Kahan, F.M., J. Biol. Chemist. 241 (1966) 428

- 36. Smith, K.D., Armstrong, J.L.u.Mc Carthy, B.J.,
Biochim.Biophys.Acta 142 (1967) 323
- 37. Crippa, M. u.Gross, P.R., Proc.N.A.S. 62
(1969) 120
- 38. Pochon, F. u.Michelson, A.M., Biochim.Biophys.
Acta 149 (1967) 99
- 39. Brimacombe,R.L.C., Griffin, B.E., Haines, J.A.,
Haslam, W.J. u.Reese, C.B., Biochemistry 4
(1965) 2452.

Lebenslauf

Am 11. März 1944 wurde ich, Rosemarie Krönicher, geb. Böttcher, als Tochter des Innenarchitekten Heinz Günther Böttcher und seiner Ehefrau Ruth, geb. Dullo in Kirchhain in der Niederlausitz geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Grundschule in Stadthagen bei Hannover und nach unserer Übersiedlung nach Hamburg im März 1954 die Rudolf-Steiner-Schule, wo ich im Frühjahr 1963 das Abitur ablegte.

Nach dem Abitur begann ich eine Lehre als Chemielaborantin bei der Firma Beiersdorf in Hamburg, die ich im Herbst 1965 durch eine Prüfung vor der Industrie- und Handelskammer in Hamburg abschloß.

Im Wintersemester 1965/66 begann ich mein Medizinstudium an der Freien Universität Berlin. Nach dem Vorphysikum im Herbst 1966 und dem Physikum im Herbst 1968 bestand ich dort das medizinische Staatsexamen.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich am Kreiskrankenhaus Norden/Ostfriesland ab, wo ich seit September 1973 als Assistenzärztin auf der Neurologischen Abteilung tätig bin.

Seit 1967 bin ich mit dem Arzt Wolf Dieter Krönicher verheiratet, wir haben eine sechs Jahre alte Tochter.

